

**Rögzített sertés hasnyálmirigy lipáz előállítás, jellemzése és
alkalmazása**

Ph. D. Tézisek

Bagi Krisztina

Témavezető:

Lehoczkiné Dr. Simon Mária

SZTE Biokémiai Tanszék

Szeged

2006

Bevezetés

A lipázok a zsírok, olajok lebontásában szerepet játszó, észterkötéseket hasító emésztőenzimek, melyek minden élőlényben előfordulnak. Biotechnológiai szempontból nagyon jelentősek, lipázokat már régóta alkalmaznak pl. a tejiparban, de a mai modern enzimentechnológiában is sok területen vezető szerepet játszanak. Eddig főleg mikrobiális lipázokat alkalmaztak sikerrel, és kevesebb példát találunk az emlős hasnyálmirigy lipázok használatára. Ezért választottuk a sertés hasnyálmirigy lipázt (PPL) vizsgálatunk tárgyául.

A rögzített enzimek – szilárd hordozóhoz kapcsolt, vagy membránokba zárt enzimek – számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek az oldott formákhoz képest: pl. könnyebben működtethetők, elkülöníthetők, szabályozhatók, és az enzim tulajdonságai, stabilitása gyakran előnyösen módosulhat. Sok rögzítési módszer létezik, és sokféle anyag felhasználható hordozóként. A mikrobiális lipázokat többnyire rögzített formában alkalmazzák: adszorpcióval, ráüleptetéssel, ill. ritkábban kovalens kötésekkel kapcsolva a hordozókra, melyeknek tulajdonságai is (pl, szemcseméret, porozitás, hidrofóbicitás) széles skálán változhat. Kevesebb példa van rögzített emlős hasnyálmirigy lipázok vizsgálatára és alkalmazására.

Egy rögzített enzim előállításakor különböző tulajdonságú hordozókat és más-más rögzítési módszert alkalmazva vizsgálni kell a lipáz aktivitására és stabilitására gyakorolt hatásukat. A rögzítésnél alkalmazott körülmények (pH, enzimmennyiség, stb.) hatással lehetnek a kötődött lipáz mennyiségére és aktivitására. Számítani lehet az enzim katalitikus tulajdonságainak, specifikitásának, stabilitásának megváltozására a rögzítés hatására.

Az enzimreakciók természetes közege legtöbbször a víz, de kiderült, hogy ezt más közeggel is helyettesíteni lehet, miközben aktivitásukat is megőrzi. Leggyakrabban szerves oldószert alkalmaznak reakcióközegként, amely tartalmaz kevés vizet is. Ilyen nem hagyományos közegű enzimreakciókat egyre gyakrabban alkalmaznak, számos előnyük miatt: a szubsztrátok jobb oldódása, a szerves közegű

enzimreakció könnyebben integrálható a hagyományos kémiai lépések sorozatába, az enzimek kevésbé oldódnak le a reaktorokról vagy a hordozókról, az oldószer véd a mikrobiális fertőzésektől is. A szerves oldószeres közeg új reakcióutakat is nyithat. Például ha a víztartalom elég alacsony, a reakcióegyensúlyok is megváltozhatnak, és a hidrolitikus reakciók megfordulhatnak, így különböző anyagok szintézise válik lehetővé a hidrolitikus enzimekkel.

Az utóbbi időben különböző szénhidrátokat észterestítenek zsírsavakkal, az ilyen észterek némelyike kiváló felületaktív tulajdonságokkal rendelkezik. Ezekre a nem ionos, természetes eredetű detergenszerekre a modern iparban óriási az igény. A fruktóz észterei is ezek közé az anyagok közé tartoznak, de a hagyományos szerves kémiai úton nehezen állíthatók elő. Ilyenkor a fruktóz hidroxilcsoportjai közül bármelyik reagálhat a zsírsavval, ezért a képződött anyagkeverék felületaktív tulajdonságai csökkennek – egyéb hátrányok mellett. Az enzimatisztikus szintézis azonban kiaknázza a regiospecifikitás előnyét, az enyhe reakciókörülmények mellett.

Lipázok (vagy más észterázok) segítségével főleg kétféle módon készíthető fruktóz-észter: míg észterestítésnél a szabad zsírsav az acil donor, átészterestítésnél leggyakrabban a zsírsav alkohollal képzett észterét alkalmazzák. Triglicerideket nagyon ritkán használnak fruktóz átészterestítésre. Ezeknek a szubsztrátoknak jelentősége, hogy a természetben mint zsírok, olajok nagy mennyiségben rendelkezésre állnak, így nincs szükség a szubsztrát (pl. zsírsav, zsírsav-észter) költséges előállítására.

A PPL szerves közegben való alkalmazása előtt azonban meg kell vizsgálni, hogy stabil marad-e az oldószerekben. Különböző szerves oldószerek tesztelésével kiválasztható közülük az enzimreakció számára legelőnyösebb, és vizsgálható az oldószer hidrofóbicitásának hatása a katalízisre. A közeg víztartalmának szintén döntő hatása lehet az enzim működésére és stabilitására, mint ahogy egyéb reakciókörülményeknek (pH, hőmérséklet, szubsztrátok mennyisége és aránya). A rögzített enzimek szerves oldószerekben is sikerrel működtethetők, azonban a szerves közegben az enzim mikrokozonyezete alapvetően különbözik a vizes közegben lévőttől,

ezért a hordozóknak és a rögzítési eljárásnak az enzim konformációs stabilitására és katalitikus aktivitására gyakorolt hatását a nem hagyományos közegben újra fel kell térképezni.

Célkitűzés

1. Rögzített PPL formákat állítunk elő különböző hordozók és rögzítési módszerek felhasználásával. Megvizsgáljuk a rögzítés hatásait a lipáz katalitikus tulajdonságaira és stabilitására vizes közegben, majd az olívaolaj hidrolízisének összehasonlítjuk az előállított enzimformák felhasználhatóságát.
2. Tanulmányozzuk a különböző szerves oldószerek hatásait a PPL stabilitására.
3. Megvalósítjuk szerves oldószeres közegben a PPL katalizált fruktóz-észter szintézist, mint modell reakciót. Az oldott és a különböző hordozóra rögzített PPL formák alkalmazhatóságát összehasonlítjuk a fruktóz-észter szintézisének.

Anyagok és módszerek

A PPL hidrolitikus aktivitásának mérése: A PPL hidrolitikus aktivitását pH-stat titrálással határoztuk meg, olívaolaj szubsztráttal, amelyből előzetesen emulziót készítettünk. Az aktivitásmérési reakcióelegy 5 ml szubsztrát emulziót, 2,5 ml desztillált vizet, 125 µl 20 %-os nátrium taurokolát oldatot és annyi 0,2 M NaOH oldatot tartalmazott (kb. 300-350 µl), hogy az elegy pH-ja 8,9 legyen. Automata titrátor használatával, pH 8.9-nél nyomon követtük a zsírsav felszabadulást. Az egyéb szubsztrátokkal (triolein, trisztearin, tributirin) azonos körülmények között végeztük a mérést.

A rögzített PPL előállítása: A PPL-t kovalensen karbodiimiddel aktivált poliakrilamid gyöngypolimerre (Akrilex C-100), illetve Szilokróm-aldehidre rögzítettük. Sorsilenre, Celite-re, Al₂O₃-ra adszorpcióval kapcsoltuk a PPL-t, míg a Dowex gyantára ionos és adszorpciók kötésekkel rögzítettük a lipázt.

Olívaolaj hidrolízise: A hidrolízist 37 °C-on, pH 8,9-nél végeztük folyamatos kevertetés mellett (300 rpm). 0,15 g olívaolajat 15 ml desztillált vízben előzetesen 1 percig turmixoltunk emulzifikáló reagens használata nélkül, és ehhez 50 U lipáz preparátumot adtunk. A hidrolízis során keletkező zsírsavak mennyiségét pH-stat titrátorral határoztuk meg.

A PPL stabilitása szerves oldószerekben: Az enzim stabilitását 20-80 % (v/v) szerves oldószert tartalmazó, 100 mM-os Tris/HCl pufferben (pH 7) tanulmányoztuk. Az enzimet 120 percig inkubáltuk 25 °C-on, majd aliquotokat vettünk, és az enzim maradék aktivitását a standard módszer szerint határoztuk meg.

Fruktóz-észterek szintézise rögzített és nem rögzített lipázokkal: A reakcióelegy 150 µmol fruktózt és 750 µmol acil donort (vajsav, tributirin) tartalmazott 15 ml acetonitrilben, melyhez 300 U hidrolitikus aktivitású PPL preparátumot (rögzített, illetve összehasonlításként a nem rögzített lipázt) adtunk. A szintézist termosztált, kevertetett batch reaktorban végeztük, 30 °C-on, 0,6 %-os víztartalomnál. a reakcióelegyből 300 µl-es mintákat vettünk és TLC-vel analizáltuk.

Vékonyréteg kromatográfia: A szintézis során keletkezett fruktóz-észtereket reaktivált szilikagél rétegen (Kieselgel-60, Merck) választottuk el, kloroform:metanol:ecetsav:víz 80:10:8:2 térfogatarányú futtatóelegy használatával. A lemezeket difenilamin-anilin-foszforsavas előhívó reagenssel lefújtuk, és 100-120 °C-on előhívtuk a fruktóz és fruktóz-észter foltokat. A lemezek analíziséhez a Gelbase Pro&Gelbase/Gelblot (UVP Ultra Violet Products) optikai denzitás meghatározására kifejlesztett computerprogramot használtuk. A fruktóz észterek azonosítása ¹³C NMR-rel történt.

Az eredmények összefoglalása

1.

A sertés hasnyálmirigy lipázt (PPL) adszorpcióval alumínium-oxidra, Celite-re és Sorsilen-re; ionos kötésekkel Dowex gyantára; kovalens kötésekkel Akrilex C-100-ra és Szilokróm-aldehidre rögzítettük. Mindegyik rögzített enzim aktív volt, és aktivitásuk 28,82 és 1114,84 U/g száraz gél között változott. Nagy aktivitással rögzült a lipáz hidrofil (pl. Akrilex C-100) és hidrofób (Sorsilen) hordozókra egyaránt, tehát a hordozó hidrofóbicitása kevésbé befolyásolta a rögzített enzim aktivitását. A rögzített enzimek stabilitását is tekintve, a PPL-t erősebben kötő hordozók (Akrilex C-100, Sorsilen) bizonyultak megfelelőnek a rögzítéshez. A kovalensen rögzített Akrilex-PPL aktivitás és stabilitás szempontjából is a legjobb volt a hagyományos közegben, ezért részletesen ennek a lipáz formának a vizsgálatával foglalkoztunk.

2.

Az Akrilex-lipáz hőstabilitása jobb volt az oldott enziménél: míg 50 °C-on, 60 perc után az oldott enzim 20 %-át őrizte meg aktivitásának, a rögzített 49 %-át. A rögzített lipáz pH 6-nál volt a legstabilabb, a lúgos pH-val szemben viszont érzékeny maradt. Ezen keresztkötések alkalmazásával próbáltunk javítani, amit glutáraldehiddel, illetve DFNB-lal végeztünk. A keresztkötött, rögzített lipáz formák pH-stabilitása javult, hőstabilitása és ureával szembeni stabilitása is tovább nőtt.

3.

Összehasonlítottuk a PPL-formák szubsztrátspecifitását triolein, tributirin és trisztearin szubsztrátokkal. Mindegyik enzimforma hidrolizálta ezeket a szubsztrátokat, azonban a flexibilisebb szerkezetű oldott lipáz a tributirint, míg a rögzített, keresztkötött formák a trioleint bontották nagyobb sebességgel. Az enzimaktivitás szubsztrátkoncentráció függésében nem tapasztaltunk eltérést az oldott és rögzített formák között, amiből valószínűsíthető, hogy aktív, működő PPL molekulák

elsősorban a gélszemcsék felszínén helyezkednek el. Az oldott és rögzített lipáz pH-optimuma egyaránt 8.9 volt, a rögzítés nem okozott változást az enzim aktív centrumában. Az enzimaktivitás optimális hőmérséklete az oldott PPL-nél 32-33 °C volt, rögzített formánál 45 °C, a keresztkötött rögzítetttnél 47 °C-ra emelkedett, jelezve a merevebb molekulaszervezetet és a jobb hőstabilitást.

4.

Tanulmányoztuk a PPL formák hidrolitikus aktivitását olívaolaj szubsztráton. Megállapítottuk, hogy a rögzített és a rögzített, keresztkötött lipáz jóval gyorsabban hidrolizálta az olívaolajat és nagyobb produktivitással rendelkezett az oldott enzimnél.

5.

A szerves oldószeres közegben való alkalmazás előtt megvizsgáltuk a lipáz formák stabilitását különböző összetételű víz-szerves oldószer elegyekben. Dimetilszulfoxid (DMSO) esetén a lipáz aktivitása 40 %-os oldószer koncentrációig nem változott, majd 50-60 % között az enzim inaktíválódott. 1,4-dioxánban, acetonitrilben és etanolban azonban az enzimaktivitás az oldószer koncentráció növekedésével egy minimum görbe szerint változott. A minimum acetonitrilben 40 %-os, dioxán és etanol esetén 50 %-os koncentrációnál következett be (20 perc alatt az enzimaktivitás 0-13 % közé csökkent), a magasabb (80 %-os) oldószertartalmú reakcióelegyekben azonban jobban megőrizte aktivitását a lipáz: 20 perc elteltével 1,4-dioxánban 70 %-át, acetonitrilben 27 %-át, etanolban 34 %-át mértük a kiindulási aktivitásnak. Az Akrilexre rögzített PPL vizsgálatánál nem tapasztaltunk számottevő stabilitásbeli eltérést. A vízben nem oldódó szerves oldószerek közül a toluolban a lipáz inaktíválódását tapasztaltuk (80 %-os oldószer koncentrációnál 20 perc alatt 16 %-ra csökkent az aktivitás), etilacetátban azonban nem észleltünk aktivitáscsökkenést.

6.

Szerves oldószeres közegben a PPL működését a fruktóz-vajsav észter szintéziséén, mint modell reakción tanulmányoztuk. Az észterszintézishez a fruktóz szubsztrát mellett vajsavat (észteresítés), illetve tributirint (átészteresítés) használtunk acil donorként. Mindkét reakciótípusban a szintézis során 2 termék keletkezett 0,54:0,46 arányban, amelyeket NMR analízissel fruktóz-1 és 6-butirátként azonosítottunk.

7.

Az észteresítéseknél használt oldószerek (n-hexán, ciklohexán, toluol, 2-metil-2-propanol, acetonitril, DMSO, piridin) közül a kisebb log P-vel rendelkező, polárosabb oldószerek (pl. 2-metil-2-propanol, acetonitril, piridin) voltak az előnyösek. Az acetonitril volt a legmegfelelőbb közeg az észterszintézishez.

8.

Vizsgáltuk a zsírsav szénatomszámának (C1-C19 között) hatását az észterszintézisre, és megállapítottuk, hogy a lánchossz növekedésével nőtt az észterszintézis C13-17 szénatomszámgig. A kettős kötések jelenléte a 10-es körüli szénatomszámnál pozitív hatással volt a lipáz katalizált észterszintézisre. Szubsztrátjaink közül az egyszerűen telítetlen undecénsavval kaptuk a legtöbb fruktóz-észtert.

9.

A reakciókörülmények fruktóz-butirát szintézisre gyakorolt hatásait vizsgáló kísérleteink rámutattak, hogy a PPL a szerves oldószeres közegű szintézis során igen kevés víz jelenlétét igényli: <0.3%, amely előnyös lehet mind az észteresítésnél és az átészteresítésnél. Az enzimaktivitás hőmérsékleti optimuma 40-45 °C volt, szemben a mikrobiális lipázok 60 °C körüli optimumával. A fruktóz és az acil donorok (vajsav, tributirin) optimális aránya 1:5 volt; az észteresítés pH-optimuma 7,4.

10.

A gyakorlati alkalmazhatóság megállapítására a különböző rögzített PPL formák szerves oldószeres fruktóz észteresítését összehasonlítottuk a nem rögzített lipázzal. Észteresítésnél mindegyik rögzített forma a nem rögzített lipáznál nagyobb fruktóz-észter mennyiséget termelt. A Sorsilen-re rögzített lipáz 10,3 %-os konverziót adott, míg a nem rögzített lipáz 0,4 %-osat. Átészteresítésnél a Celite-re és a Sorsilenre rögzített formák adták a legnagyobb konverziót: 57, illetve 16,8 %-osat, miközben a nem rögzített PPL-nél 8,7 %-os volt a konverzió. Szemben a vizes közegben tapasztaltakkal, a rögzítésre használt hordozó hidrofóbicitása fontos volt az egyes enzimformák reakciósebessége és kitermelése szempontjából: észteresítésnél a hidrofób Sorsilen, átészteresítésnél az enyhén hidrofób Celite bizonyult megfelelő hordozónak.

11.

Vizsgáltuk az egyes lipáz formák működési stabilitását is. A legjobb stabilitást a kovalensen kötött Akrilex-lipáz mellett az adszorpciósan rögzített Celite-lipáz és Al_2O_3 -lipáz formák mutatták. A szerves oldószeres közegben – ellentétben a hagyományos közegben tapasztaltakkal – a kovalensnél gyengébb adszorpciós kötőerők is megfelelőnek bizonyultak a rögzített enzimformák stabilitásának megőrzésére.

12.

A fruktóz vajsavas észteresítését, illetve tributirines átészteresítését is összehasonlítottuk a szabad és rögzített PPL formáknál. Megállapítottuk, hogy az átészteresítés nagyobb hatásokkal ment végbe, mint az észteresítés, esetenként egy nagyságrenddel nagyobb kitermelést is adott.

Összefoglalva, az előállított és vizsgált rögzített lipázok közül már különböző célokra felhasználható formákat lehet választani: vizes közegű

hidrolízisnél az Akrilex-lipáz, szerves oldószeres közegű észterezésénél a Sorsilenhez rögzített enzim, átészterezésénél pedig a Celite-hez kötött lipáz nyújtotta a legnagyobb kitermelést.

Eredményeink az egyes lipáz formák tulajdonságainak feltárása révén gyakorlati alkalmazásuk kibővítéséhez járulhatnak hozzá, és széles körben használt észterek kémiai szintézisének alternatív lehetőségét nyújthatják.

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

K. Bagi, L. M. Simon and B. Szajáni:

Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase

Enzyme and Microbial Technology, 20, 531-535, 1997

IF: 1.705

L. M. Simon, K. László, A. Vértesi, K. Bagi and B. Szajáni:

Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems

J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 4, 41-45, 1997

IF: 1.685

K. Bagi, L. M. Simon:

Comparison of esterification and transesterification of fructose by porcine pancreas lipase immobilized on different supports.

Biotechnol. Tech. 13, 309-312, 1999

IF: 0.557

S. Andrzejak, L. M. Simon, K. Bagi, M. Wójcik

Termiczna dezaktywacja lipazy z trzustki zwierzęcej.

Inżynieria Chemiczna i Procesowa 25, 571-576, 2004

IF: 0.337

ΣIF: 4.284

Egyéb publikációk

A. Vértesi, K. Bagi and L. M. Simon:

Study of the operation of co-immobilized glucose-6-phosphate isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in a flow injection system

Acta Biol. Szeged 41, 15-22, 1996

Lehoczkine Simon M., Kissné Deér A., Bagi K., Vértesi A., László K.:

Hidroláz enzimek szerepe xenobiotikumok detoxifikálásában balatoni halakban..

A Balaton kutatásának 1997-es eredményei, Szerk.: Salánki J. és Padisák J.

MTA VEAB Kiadó, Veszprém, 194-198, 1988

L. M. Simon, K. László, M. Kotormán, A. Vértesi, K. Bagi and J. Nemcsók:

Effects of synthetic pyrethroids and metidathion on activities of some digestive enzymes in carp (*Cyprinus carpio L.*)

J. Environ. Sci. Health. B. 34, 818-828, 1999

Poszterek, előadások

K. Bagi, K. László, L. M. Simon and B. Szajáni

Immobilization and characterization of lipase from porcine pancreas

2nd International Conference of the Hungarian Biochemical Society, 1995, Szeged

K. Bagi, L. M. Simon and B. Szajáni

Stability of lipase from porcine pancreas in water-organic solvent systems

3rd Advanced Course on Applied Biocatalysis, 1996, Balatonfüred

K. Bagi

Preparation and stability study of immobilized pancreas lipase

1st National Conference of PhD Students, 1996, Debrecen

K. Bagi and L. M. Simon

Application of porcine pancreas lipase for production of fructose esters

8th European Congress on Biotechnology, 1997, Budapest

K. László, A. Vértesi, K. Bagi, L. M. Simon and B. Szajáni

Effects of polar organic solvents on stabilities of some hydrolytic enzymes

8th European Congress on Biotechnology, 1997, Budapest

SZEGEDI
TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi Kar
Biokémiai Tanszék

Dr. Lehoczki Endréné Dr. Simon Mária
egyetemi docens
6726 Szeged, Közép fasor 52.
☒ 6701 Szeged, Pf.: 533
Tel/fax: 62-544-887
E-mail: lmsimon@bio.u-szeged.hu

Nyilatkozat

Alulírott, mint az alábbiakban felsorolt közlemények felelős szerzője (corresponding author) kijelentem, hogy Bagi Krisztina PhD jelölt a szóban forgó, általa nem első szerzőként jegyzett alábbi publikációkban közreadott eredményekhez és a közlemény létrehozásához jelentős mértékben járult hozzá, ennél fogva az azokban közölt tudományos eredményeket jogosan használja fel PhD dolgozatának elkészítéséhez.

L. M. Simon, K. László, A. Vértesi, K. Bagi and B. Szajáni:

Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems

J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 4, 41-45, 1997

IF: 1.685

S. Andrzejak, L. M. Simon, K. Bagi, M. Wójcik

Termiczna dezaktywacja lipazy z trzustki zwierzęcej.

Inżynieria Chemiczna i Procesowa 25, 571-576, 2004

IF: 0.337

Szeged, 2006. szeptember 17.

Lehoczkiné Dr. Simon Mária
témavezető